

Estrategias experimentales para el estudio del fosfoproteoma en células progenitoras de hígado de ratón (MLP-29)

Enrique Santamaría, Henar Hevia, Javier Muñoz, Joaquín Fernández-Irigoyen, Victor Segura, Jesús Prieto, Fernando J. Corrales¹

Unidad de Proteómica, Genómica y Bioinformática. Área de Hepatología y Terapia Génica. Universidad de Navarra. Centro para la Investigación Médica Aplicada (CIMA).

Resumen:

La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional que juega un papel central en la regulación de procesos celulares esenciales y, por ello, la caracterización del fosfoproteoma y sus alteraciones es clave para establecer los mecanismos moleculares que permiten elaborar respuestas adaptativas o que condicionan la progresión de patologías. En los últimos años se han desarrollado un gran número de métodos que permiten abordar el estudio de fosfoproteínas basados en electroforesis, cromatografía y espectrometría de masas. Definir la estrategia experimental eligiendo la combinación de las técnicas más adecuada es esencial para asegurar la consecución de los objetivos que se plantean. En este trabajo hemos evaluado la capacidad y eficacia de varias metodologías para describir el fosfoproteoma de células hepáticas (MLP-29) en estado basal. En primer lugar, se analizó la especificidad de la tinción para fosfoproteínas Pro Q-diamond tras resolver los extractos proteicos en geles 2D. Paralelamente, se obtuvo una fracción enriquecida en fosfoproteínas que se resolvió tanto en geles SDS-PAGE en condiciones reductoras como en geles 2D para abordar su identificación mediante espectrometría de masas MALDI TOF o nanoLC-ESI-MS/MS. Adicionalmente, una fracción de la mezcla de fosfoproteínas se analizó mediante nanoLC-ESI-MS/MS sin fraccionamiento previo. Los resultados que hemos obtenido indican que las estrategias seguidas son complementarias ya que cada una aporta la identificación de un grupo de proteínas diferente y que por lo tanto es relevante en la definición del fosfoproteoma de las células MLP-29. Hasta ahora hemos identificado 136 proteínas fosforiladas, que han sido agrupadas en función del proceso biológico en el que están implicadas con el programa *Ingenuity*.

Palabras clave:

Pro-Q Diamond, cromatografía de afinidad, fosfoproteína, espectrometría de masas

Introducción

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más importantes en la naturaleza ya que está implicada en la regulación de procesos celulares como metabolismo, homeostasis, transcripción, degradación de proteínas, señalización

celular, proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Graves *et al.*, 1999). La secuenciación del genoma ha revelado que un 2-3% de los genes eucariotas probablemente codifiquen para proteínas kinasas, encargadas de transferir el grupo fosfato a su sustrato (Manning *et al.*, 2002) junto con más de 100 fosfatasa, encargadas de catalizar la reacción inversa (Venter *et al.*, 2001). Además, se ha estimado que el 30% de proteínas expresadas por una célula eucariota se fosforilan en algún momento de su ciclo (Hubbard *et al.*, 1993). La complejidad del proteoma hace que sea necesario disponer de métodos altamente selectivos para el enriquecimiento de proteínas fosforiladas que nos permitan identificar los residuos que incorporan el grupo fosfato y así definir el papel biológico de esta modificación.

¹ Correspondencia: Fernando J. Corrales. División de Hepatología y Terapia Génica. CIMA. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. 31008 Pamplona, España. Tel.: 34-948-194700; fax: 34-948-194718. Dirección e-mail: fjcorrales@unav.es.

Existen principalmente tres razones que hacen que el análisis del fosfoproteoma no pueda realizarse de una manera sencilla y directa (Larsen *et al.*, 2005). En primer lugar, la presencia de fosfatasa pueden defosforilar los residuos fosforilados por lo que es imprescindible inhibir su actividad durante la preparación y manipulación de la muestra. En segundo lugar, la estequiometría de la fosforilación es relativamente baja, ya que desde un punto de vista funcional, la modificación de una fracción de las moléculas es suficiente para orquestar una respuesta biológica (Larsen *et al.*, 2005). Además, muchas de las moléculas de señalización que son susceptibles de ser fosforiladas presentan unos niveles de expresión sumamente bajos, lo que sugiere la necesidad de un enriquecimiento previo al análisis. En tercer lugar, las proteínas pueden presentar varios estados de fosforilación implicando diferentes residuos y este perfil puede variar en función de la situación celular (Larsen *et al.*, 2005). En los últimos años se han realizado importantes avances metodológicos, y sin embargo, no existe una técnica que aplicada de forma individual nos permita conocer y caracterizar el fosfoproteoma de un sistema celular de una manera global y en un único experimento. Por eso, es necesario conocer la capacidad y eficacia de cada una de las posibles aproximaciones tecnológicas para combinarlas en una estrategia experimental que se ajuste a las necesidades del estudio de interés. En este trabajo queremos aportar nuestra experiencia en la aplicación de algunos de los métodos más utilizados en la actualidad al estudio del fosfoproteoma de células hepáticas MLP-29, considerando que los resultados obtenidos pueden ser de utilidad a otros investigadores a la hora de elaborar sus propias estrategias de análisis.

Material y Métodos

Reactivos. Se utilizaron los siguientes reactivos: Tinción de Pro-Q Diamond (Molecular Probes), colorante Sypro Ruby (Bio-rad), kit de enriquecimiento de fosfoproteínas (Qiagen), tripsina (Promega). Los reactivos de electroforesis utilizados fueron de Bio-Rad.

Cultivo celular. Se utilizaron células progenitoras de hígado de ratón MLP-29. Las células se crecieron en medio DMEM suplementado con 5% de suero bovino fetal y 1% de glutamina-penicilina-estreptomomicina.

Enriquecimiento en fosfoproteínas. Para obtener lisados celulares enriquecidos en proteínas fosforiladas, se utilizó un kit de enriquecimiento en fosfoproteínas (Qiagen Ref. 37101) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional. Tras lavar las células tres veces con PBS, se recogieron y la suspensión se centrifugó a 500 x g durante 10 min. El precipitado celular se homogenizó en tampón de lisis que contiene urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4% (v/v), DTT 1% (v/v) y anfolitos 3-10 0.5% (Bio-Rad). Los lisados se centrifugaron durante 1 hora a 75.000 rpm y 15°C. La electroforesis bidimensional se realizó como se ha descrito previamente (Santamaria *et al.*, 2003, 2006). Tanto la tinción con Pro-Q Diamond como la tinción Sypro Ruby se realizaron en las condiciones recomendadas por el fabricante.

Identificación de las fosfoproteínas mediante espectrometría de masas. La digestión de las bandas y el procesamiento del hidrolizado peptídico se realizaron como se ha descrito previamente (Fernandez-Irigoyen *et al.*, 2005). Los espectrómetros de masas utilizados han sido un MALDI-TOF GL-REF y un Q-TOF *micro* (Waters). Los datos de espectrometría de masas se procesaron con el software *Masslynx 4.0* (Waters). Para la identificación de las proteínas, se utilizaron los motores de búsqueda *Proteinlynx Global Server 2.0* (Waters) y *Phenyx* (Geneva Bioinformatics). Las bases de datos empleadas para las búsquedas fueron SwissProt (*Swiss-Prot Release 46.3*) y Ensembl (*Ensembl Mouse Release 29.33*). Sólo se tuvieron en cuenta las identificaciones coincidentes con ambos motores de búsqueda y con un valor de p asociado de 0.001 (el valor de p-value indica la probabilidad de encontrar al azar un péptido en una base de datos aleatorizada). Además, se calculó la tasa de error, definida como el porcentaje de asignaciones falsas esperadas considerando el umbral del valor de p anteriormente mencionado (información suplementaria). Finalmente, la clasificación e interpretación funcional de las proteínas identificadas se realizó con el programa *Ingenuity*.

Resultados y discusión

La forma más sencilla de analizar el fosfoproteoma de un sistema biológico es utilizar reactivos que detecten las fosfoproteínas en geles mono- o bidimensionales de manera selectiva. Desde 1970 se han descrito varios

métodos para teñir las fosfoproteínas (Cutting *et al.*, 1973, Debruyne *et al.*, 1983) pero hoy en día no se utilizan de manera rutinaria en los laboratorios por su baja especificidad y sensibilidad. En nuestro caso, hemos utilizado el método de tinción Pro-Q Diamond desarrollado recientemente (Schulenberg *et al.*, 2003). Este fluoróforo es capaz de discriminar entre proteínas fosforiladas y no-fosforiladas y es reversible. Además, es compatible con otros métodos de tinción fluorescente como Sypro Ruby. Esto hace posible la tinción secuencial con los 2 fluorocromos, facilitando la visualización de las fosfoproteínas y el perfil global de proteínas en un solo gel. Para valorar la especificidad de la tinción Pro-Q Diamond analizamos un mismo extracto antes y después de tratar con fosfatasa alcalina (figura. 1). De acuerdo con otros autores (Makrantonis *et al.*, 2005) la defosforilación disminuye el marcaje con Pro-Q Diamond, lo que sugiere que este fluoróforo se une preferencialmente a proteínas fosforiladas. Sin embargo, apreciamos un marcaje residual que puede resultar del rendimiento parcial de la enzima utilizada o de la interacción del fluoróforo con algunas proteínas no fosforiladas, quizás proteínas ácidas, como ocurre con otros métodos de selección de fosfoproteínas o fosfopéptidos.

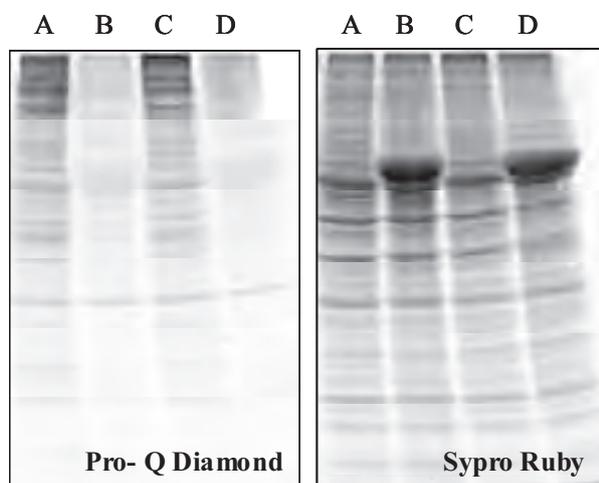


Figura 1. Especificidad de la tinción Pro-Q Diamond. Los extractos de proteínas (20µg/pocillo) correspondientes a células MLP-29 se separaron en un gel de poliacrilamida en condiciones reductoras que inicialmente se tiñó con Pro-Q Diamond (izquierda) y posteriormente con la tinción total Sypro Ruby (derecha). Las calles A y C corresponden a los extractos celulares y las calles B y D corresponden a los mismos extractos tratados con fosfatasa alcalina. La pérdida en el marcaje de Pro-Q Diamond en las muestras tratadas con fosfatasa alcalina indica que el fluoróforo se une preferencialmente por las proteínas fosforiladas. La banda prominente que se observa al tratar con fosfatasa alcalina se debe a esa misma enzima.

Para investigar esta última posibilidad, se resolvieron los extractos proteicos mediante electroforesis bidimensional (figura. 2). Cuando se utilizó un rango de pH 5-8 observamos un perfil claramente diferente al teñir con Sypro Ruby o Pro-Q Diamond, sugiriendo la presencia de proteínas abundantes no fosforiladas y proteínas minoritarias fosforiladas. Sin embargo, ambas tinciones mostraron resultados similares cuando el isoelectroenfoco se realizó en un rango de pH 3-6, lo que apoyaría la hipótesis de que Pro-Q Diamond interacciona de forma no específica con proteínas ácidas.

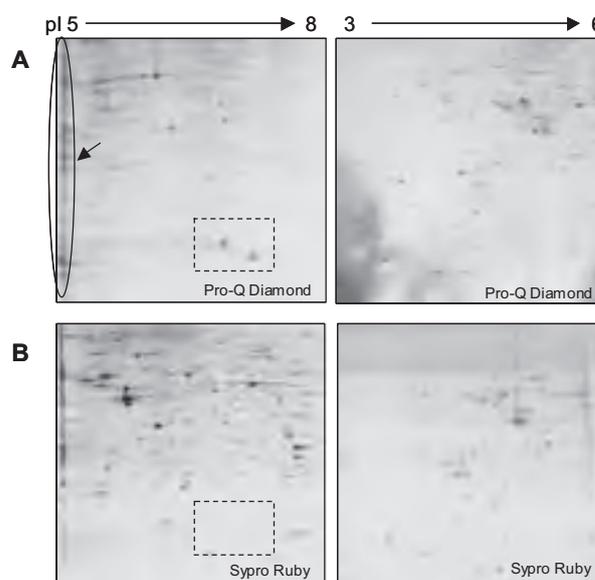


Figura 2. Separación de extractos celulares de MLP-29 mediante electroforesis bidimensional utilizando diferente rango de pH. Se ha utilizado 125µg de proteína A) Geles teñidos con Pro-Q Diamond. B) Geles teñidos con Sypro Ruby. La flecha indica proteínas mal resueltas en el rango de pH 5-8 (proteínas ácidas). Los cuadrados discontinuos muestran la presencia de dos proteínas altamente fosforiladas cuya abundancia es prácticamente indetectable con Sypro Ruby.

Dada la complejidad del proteoma y teniendo en cuenta la baja estequiometría de la fosforilación, utilizamos un método de enriquecimiento de fosfoproteínas basado en una cromatografía de afinidad (Metodiev *et al.*, 2004, Puente *et al.*, 2004, 2006). Partimos de 2.5mg de proteína total procedente de células MLP-29 con una concentración de 0.1mg/ml y tras realizar varios lavados, obtuvimos en el eluido 100 µg de proteína aproximadamente. Las proteínas así obtenidas mostraron una mayor tinción con Pro-Q Diamond que el extracto sin fraccionar (figura. 3) de lo que se deduce que la fracción purificada está enriquecida en proteínas fosforiladas o ácidas. Aunque la comparación de los

perfiles proteicos antes y después de la purificación indica una tinción similar de algunas proteínas, la pauta de proteínas es, en general, diferente, sugiriendo que el procedimiento ha permitido una purificación al menos parcialmente selectiva de fosfoproteínas (figura. 4). Tras la digestión con tripsina y el análisis de los péptidos trípticos mediante MALDI TOF MS identificamos 28 proteínas que corresponden a subunidades del proteosoma, proteínas del citoesqueleto y chaperonas moleculares, cuya fosforilación ha sido descrita en la literatura (información suplementaria). Si bien esta estrategia permitiría realizar estudios comparativos sencillos en base al análisis diferencial de los geles bidimensionales, las limitaciones inherentes a la 2DE junto con el bajo rendimiento de la cromatografía de afinidad utilizada para enriquecer la mezcla en fosfoproteínas nos condujeron a explorar otros métodos de análisis. La separación de la mezcla enriquecida mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y el posterior análisis nanoLC-ESI-MS/MS de los hidrolizados trípticos de las 4 secciones en las que se dividió el gel permitió identificar 65 proteínas potencialmente fosforiladas (información suplementaria). Este método no permite, sin utilizar un método de marcaje diferencial, realizar un análisis comparativo, pero incrementa el número de identificaciones debido, al menos en parte, a la falta de restricciones que impone la 2DE. En paralelo, analizamos un digerido tríptico de la mezcla enriquecida en fosfoproteínas mediante nanoLC-ESI-MS/MS sin separación electroforética previa. Los péptidos se separaron en una columna de fase reversa C18 conectada a un Q-TOF y se eluyeron mediante un gradiente lineal de acetonitrilo del 4 al 40% en 90 o 240 minutos. Conseguimos identificar 28 y 72 proteínas, respectivamente, cuya fosforilación ha sido previamente descrita en otros estudios (información suplementaria). En ambos casos observamos que la complejidad de la muestra excedía la capacidad analítica del instrumento lo que impone la necesidad de utilizar un fraccionamiento previo que evite la coelución de más de 3 iones diferentes en cada ciclo. En todos los análisis realizados mediante nanoLC-ESI-MS/MS, la tasa de error no superó el 4% (véase información suplementaria). La información obtenida a partir de los 4 métodos de análisis utilizados es complementaria. En total se consiguieron 193 identificaciones que correspondían a 136 proteínas únicas (información suplementaria). Entre ellas, el 8.08% (11 proteínas) se detectaron en tres de los análisis realizados, el 24.26% (33 proteínas) en dos y por último, el 67.64% (92 proteínas) en uno. El escaso solapamiento entre los grupos de proteínas identificadas indica que los métodos utilizados son complementarios y que, por lo tanto, el empleo de uno u otro sólo resolverá parcialmente el problema.



Figura 3. Análisis mediante electroforesis bidimensional y posterior tinción con Pro-Q Diamond, de las proteínas fosforiladas enriquecidas mediante cromatografía de afinidad. Para el enriquecimiento en fosfoproteínas se utilizó el kit de Qiagen (ref. 37101). La calle 1 corresponde a 10 μ g de extracto total de células MLP-29 mientras que la calle 2 corresponde a 10 μ g de proteína fosforilada purificada.

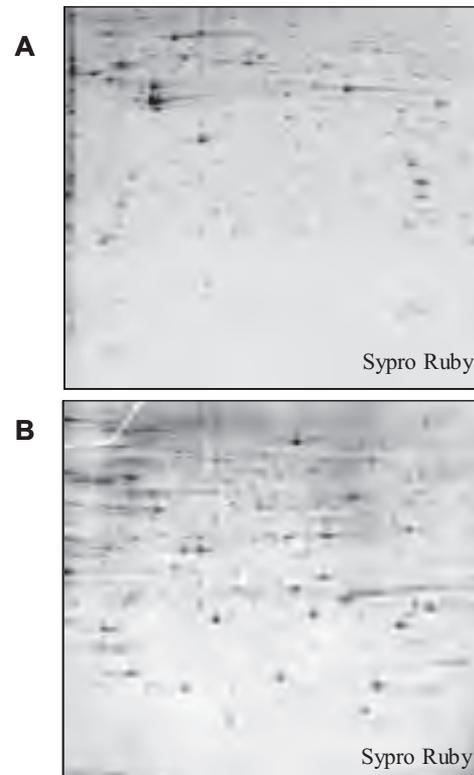
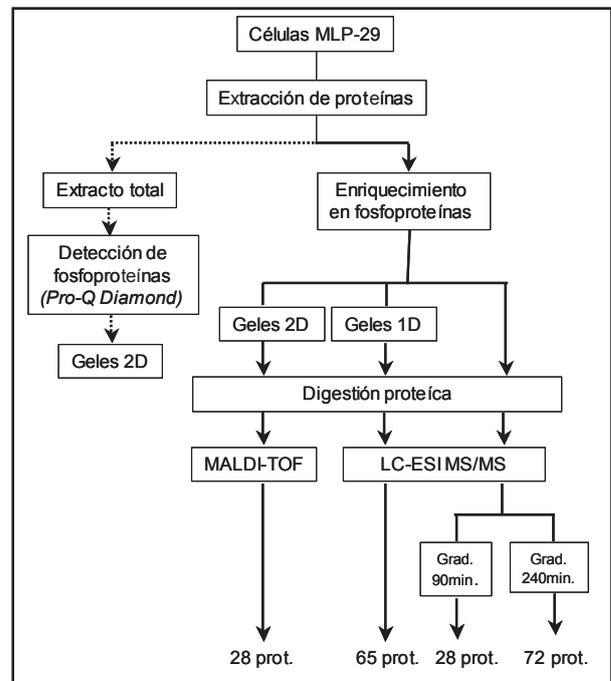


Figura 4. Análisis mediante electroforesis bidimensional de las muestras antes y después del proceso de purificación de fosfoproteínas mediante cromatografía de afinidad. A) 125 μ g de extracto total de células MLP-29. B) 125 μ g de proteína fosforilada purificada de células MLP-29.

Uno de los aspectos más interesantes de la proteómica es integrar los resultados obtenidos para obtener conclusiones funcionales. En nuestro caso hemos analizado las fosfoproteínas identificadas con el programa *Ingenuity*, aplicación que permite obtener una visión general de los mecanismos y vías de señalización que relacionan un conjunto de proteínas entre sí. Las redes de interacción obtenidas convergían en la señalización de citoquinas como TGF-β1 y TNF y en factores de transcripción como p53 y MYC (información suplementaria). Por otra parte, las funciones biológicas en las que participan las proteínas identificadas están relacionadas con cáncer, ciclo celular, muerte celular, enfermedades hepáticas y crecimiento y proliferación celular.

En este trabajo se han descrito varias aproximaciones para el estudio del fosfoproteoma en un sistema celular (Esquema 1) que, como se deduce de los resultados, son complementarias entre sí. La elección de una u otra dependerá de los objetivos del estudio, por ejemplo, los análisis comparativos requerirán estrategias basadas en el análisis de geles bidimensionales o en separaciones cromatográficas de las especies peptídicas previo marcaje diferencial (SILAC, ICAT, ITRAQ) (Olsen *et al.*, 2006). En cualquier caso, de nuestro análisis del fosfoproteoma de células MLP-29, a nivel de proteína, se puede deducir que es necesario, en primer lugar, enriquecer la muestra utilizando métodos selectivos para fosfoproteínas. Sin embargo, la complejidad de la muestra resultante requiere la utilización de métodos adicionales de fraccionamiento que permitan aumentar el rendimiento de los análisis. En la

actualidad estamos aplicando métodos de selección de fosfopéptidos utilizando IMAC (Nuhse *et al.*, 2003, Gruhler *et al.*, 2005) y TiO₂ (Larsen *et al.*, 2005) a partir de los extractos ya enriquecidos en fosfoproteínas.



Esquema 1. Principales técnicas utilizadas en el estudio del fosfoproteoma de la línea celular MLP-29. Se han utilizado el colorante *Pro-Q Diamond* para teñir y visualizar las fosfoproteínas en geles 1D ó 2D y la cromatografía de afinidad para purificar las proteínas fosforiladas. Para la identificación de las fosfoproteínas se ha utilizado espectrometría de masas MALDI-TOF o nanoLC-ESI-MS/MS.

Bibliografía

Cutting J A. and Roth T F. 1973. Staining of phosphoproteins on acrylamide gel electropherograms. *Analytical Biochemistry* 54: 386-394.

Debruyne I. 1983. Staining of alkali-labile phosphoproteins and alkaline phosphatases on polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 133: 110-115.

Fernandez-Irigoyen J, Santamaria E, Sesma L, Muñoz, J. et al. 2005. Oxidation of specific methionine and tryptophan residues of apolipoprotein A-I in hepatocarcinogenesis. *Proteomics* 5: 4964-4972.

Graves J D. and Krebs E G. 1999. Protein phosphoryla-

tion and signal transduction. *Pharmacology & Therapeutics* 82: 111-121.

Gruhler A, Olsen J V, Mohammed S, Mortensen P. et al. 2005. Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Molecular & Cellular Proteomics* 4: 310-327.

Hubbard M J. and Cohen P. 1993. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends in Biochemical Sciences* 18: 172-177.

Larsen M R, Thingholm T E, Jensen O N, Roepstorff P. et al. 2005. Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures

- using titanium dioxide microcolumns. *Molecular & Cellular Proteomics* 4: 873-886.
- Manning G, Whyte D B, Martinez R, Hunter T. et al. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.
- Makrantonis V, Antroubus R, Botting C H. and Coote P J. 2005. Rapid enrichment and analysis of yeast phosphoproteins using affinity chromatography, 2D-PAGE and peptide mass fingerprinting. *Yeast* 22: 401-414.
- Metodiev M V., Timanova A. and Stone D E. 2004. Differential phosphoproteome profiling by affinity capture and tandem matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics* 4: 1433-1438.
- Nuhse T S, Stensballe A, Jensen O N. and Peck S C. 2003. Large-scale analysis of in vivo phosphorylated membrane proteins by immobilized metal ion affinity chromatography and mass spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics* 2: 1234-1243.
- Olsen J V, Blagoev B, Gnad F, Macek B. et al. 2006. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127: 635-648.
- Puente L G, Borris D J, Carriere J F, Kelly J F. et al. 2006. Identification of candidate regulators of embryonic stem cell differentiation by comparative phosphoprotein affinity profiling. *Molecular & Cellular Proteomics* 5: 57-67.
- Puente L G, Carriere J F, Kelly J F. and Megeney L A. 2004. Comparative analysis of phosphoprotein-enriched myocyte proteomes reveals widespread alterations during differentiation. *FEBS Letters* 574: 138-144.
- Puente L G, Voisin S, Lee R E. and Megeney L A. 2006. Reconstructing the regulatory kinase pathways of myogenesis from phosphopeptide data. *Molecular & Cellular Proteomics* 5: 2244-2251.
- Santamaria E, Avila M A, Latasa M U, Rubio A. et al. 2003. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 3065-3070.
- Santamaria E, Muñoz J, Fernández-Irigoyen J, Sesma, L. et al. 2006. Molecular profiling of hepatocellular carcinoma in mice with a chronic deficiency of hepatic s-adenosylmethionine: relevance in human liver diseases. *Journal of Proteome Research* 5: 944-953.
- Schulenberg B, Aggeler R, Beechem J M, Capaldi R A. et al. 2003. Analysis of steady-state protein phosphorylation in mitochondria using a novel fluorescent phosphosensor dye. *Journal of Biological Chemistry* 278: 27251-27255.
- Venter J C, Adams M D, Myers E W. et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 91: 1304-1351.